

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭57-50894

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 P 7/62

A 61 K 31/215

//(C 12 P 7/62

C 12 R 1/465)

(C 12 P 7/62

C 12 R 1/645)

識別記号

厅内整理番号

6760-4B

ADN

6408-4C

⑬ 公開 昭和57年(1982)3月25日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 13 頁)

⑭ ML-236B誘導体の製造法

⑮ 特 願 昭55-124385

⑯ 出 願 昭55(1980)9月8日

⑰ 発明者 寺原昭

東京都品川区広町1丁目2番58

号三共株式会社醸酵研究所内

⑱ 発明者 田中実

東京都品川区広町1丁目2番58

号三共株式会社中央研究所内

⑲ 出願人 三共株式会社

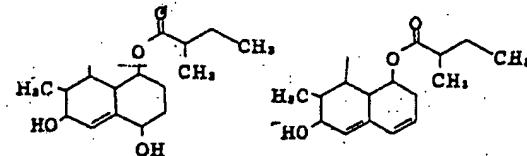
東京都中央区日本橋本町3丁目

1番地の6

⑳ 代理人 弁理士 梶出庄治

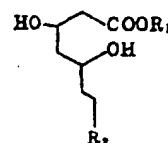
明細書

1. 発明の名称  
ML-236B誘導体の製造法



2. 特許請求の範囲

ML-236Bを式(1)で示されるML-236B誘導体に変換し得るアブシディア属、カニンガメラ属、シンセフアロスボラム属またはストレブトマイセス属に属する微生物を、ML-236Bを含有する培地で培養するか、或いはこれら  
の微生物の酵素抽出液と接触せしめて、ML-  
236Bを式



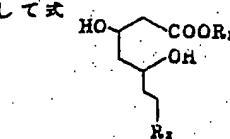
(1)

(式中、R1は水素原子、低級アルキル基またはアルカリ金属を示し、R2は基

または  
式(1)で示され  
るML-236B誘導体もしくはこの開環ラクトン体に変換せしめ、培養物より該ML-236B誘導体を採取することを特徴とするML-236B誘導体の製造法。

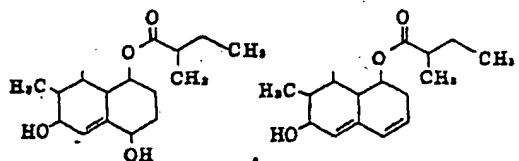
3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物の作用によりML-236Bを変換して式

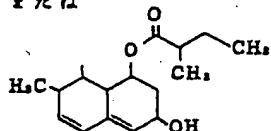


(1)

て示されるML-236B誘導体もしくはこの閉環ラクトン体を製造する方法に関するものである。上記式中、R<sub>1</sub>は水素原子；メチル、エチル、プロピル、イソブロピル、ブチル、イソブチルなどの低級アルキル基；ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属を示す。R<sub>2</sub>は基



または



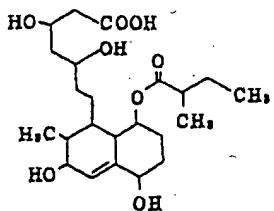
を示す。

前記一般式(I)を有する化合物はコレステロールの合成を阻害することにより、血中の脂質を低下させる作用を有し、例えば高脂血症治療剤、動脈硬化予防薬として医薬に使用すること

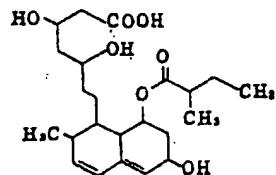
が出来る。

前記式(I)で示される物質の中、

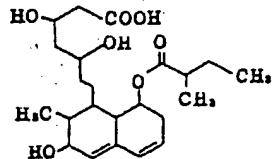
式



で示される物質をDUM-3と略称し、式



で示される物質をDUM-4と略称し、式



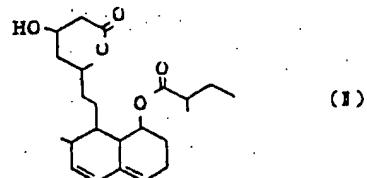
で示される物質をIso DUM-4と略称する。

DUM-3はML-236Bの化学変換生成物として(特願昭55-53057)、またDUM-4は動物に対するML-236B投与実験中にその代謝産物として(特願昭55-76127)、本出版人の研究室で既に分離されていたものである。

前記式(I)で示される物質はいずれもコレステロール合成阻害作用を有するが、特にDUM-4のコレステロール合成阻害作用は顕著であり、ML-236Bの10倍以上の阻害作用を示す。しかしながら、DUM-4はML-236Bを投与した動物の代謝産物としてのみ得られていたものであり、量産性に乏しく、従つて本物質の経済的な生産方法を検討していたところ、微生物の作用により、ML-236Bを式(I)を有する物質に変換せしめ得ることを見出し、本発明を完成した。

ML-236B自体は既知物質であり、青カビの一種ペニシリウム・チトリエムの代謝産物より分離、精製された物質で、式(II)に示される

化学構造を有しており、実験動物から分離した酵母系や培養細胞系においてコレステロールの合成をその律速酵素の3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイムAリダクターゼと競合することにより阻害し、動物の個体レベルにおいても強力な血清コレステロールの低下作用を示すことが知られている(特開昭50-155690号、ジャーナル・オブ・アンチビオティクス 29巻 1346~1348頁 1976年)。



ML-236Bを前記式(I)で示される物質に変換せしめ得る微生物としてはアブシディア(Absidia)属、カニンガメラ(Cunninghamella)属、シンセフアロスボラム(Syncephalosporum)属およびストレプトマイセス(Streptomyces)

純に属する ML-236B 変換菌があげられる。これらに属する微生物の中、特に  
 アブシディア・コエルレア IFO 4423  
 (Absidia coerulea)  
 カニンガメラ・エチヌータ IFO 4445  
 (Cunninghamella echinulata)  
 シンセフアロスボラム・ラセモーサム IFO  
 4814  
 (Syncephalosporum racemosum)  
 シンセフアロスボラム・ラセモーサム IFO  
 4828  
 (Syncephalosporum racemosum)  
 ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス  
 NRRL 1283  
 (Streptomyces roseochromogenus)  
 ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス  
 IFO 3363  
 (Streptomyces roseochromogenus)  
 ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス  
 IFO 3411

(Streptomyces roseochromogenus)  
 ストレプトマイセス・ハルステディ IFO  
 3199  
 (Streptomyces halstedii)  
 ストレプトマイセス・プラテンシス NRRL  
 2364  
 (Streptomyces platensis)  
 ストレプトマイセス・ファルビシマス NRRL  
 B-1453  
 (Streptomyces fulvissimus)

が好適である。

本発明において好適に用いられる微生物は、  
 公的な菌保存機関 (IFO または NRRL) より入  
 手可能である。

ML-236B を前記式 (I) で示される物質に  
 変換せしめるには、微生物菌体はもちろん、場合によつてはこれらの微生物の無細胞抽出液を  
 ML-236B と接触せしめることによつても達成される。

この場合、微生物培養では培養条件によつて

式 (I) を有する化合物はカルボン酸型およびラ  
 クトン型或いはアルカリ金属塩として生成する。  
 また休止菌体系および無細胞抽出液ではアルカ  
 リ金属塩として得られる。

次に実施例を示す。

#### 実施例 1

下記組成の培地 100 ml を含有する 500 ml 容  
 坩埚フラスコ 20 本にアブシディア・コエルレア  
 IFO 4423 を植菌し、26°C、120 rpm で振盪  
 培養し、2 日後、ML-236B Na 塩を最終濃度  
 で 0.05% になるように添加して更に 5 日間  
 26°C、120 rpm で培養する。

#### 培地組成

グルコース	2.0%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15
Mg SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.15
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1
ペプトン	0.1
C. S. L	0.2
イーストエキストラクト	0.1

ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.001
水道水	残

(pH 7.0 に調整)

培養終了後、変換反応液を戻過し、伊波をト  
 リフルオロ酢酸で pH 3 に調整した。次いで、1  
 ml の酢酸エチルで 3 回抽出すると DUM-3,  
 DUM-4 及び Iso DUM-4 を含む区分が得  
 られる。この中、DUM-3 区分は薄層クロマ  
 トグラフィー (TLC) (プレート: メルク社  
 製シリカゲル Art 5715 惠株; ベンゼン: ア  
 セトン: 酢酸 = 50 : 50 : 3) により R<sub>f</sub> 値 0.2  
 を示す。DUM-3 区分の抽出液を飽和食塩水  
 液で洗浄し、抽出液を減圧乾固してラクトンを  
 得た。残渣をローパー・カラム (メルク社製  
 RP-8 サイズ A) を用い、25% アセトニトリ  
 ルで溶出し、DUM-3 のラクトン体として  
 385 ml を得た。

#### DUM-3 ラクトンの特性値

- 1) 融点: 63 ~ 67°C

- 2) 質量分析値 ( $M^+$ ) : 424 ( $C_{23}H_{34}O_7$ )  
 3) 紫外部吸収スペクトル(メタノール)：  
 宿端吸収のみ  
 4) 赤外部吸収スペクトル(KBr)  $\nu_{max}$   $\text{cm}^{-1}$  :  
 3300, 1720  
 5) NMRスペクトル( $CDCl_3$ ) δ ppm :  
 5.9 (1H, 二重二重線,  $J = 1.5, 5\text{ Hz}$ )  
 5.5 (1H, 多重線)  
 4.3 (2H, 多重線)  
 3.9 (1H, 二重二重線,  $J = 3, 5\text{ Hz}$ )

## 実施例 2

実施例 1 に示したのと同組成の培地 100mL を含有する 500mL 容坂口フラスコ 20 本にアブシディア・コエルレア IFO 4423 を種蔭し, 26°C, 120 rpm で振盪培養し, 2 日後, ML-238 B Na 塩を最終濃度で 0.05% になるように添加して更に 5 日間 26°C, 120 rpm で培養する。

培養終了後, 變換反応液を沪過し, 沪液をトリフルオロ酢酸で pH 3 に調整した。次いで, 1 mL の酢酸エチルで 3 回抽出すると DUM-3,

Iso DUM-4 および DUM-4 を含む区分が得られる。この中, Iso DUM-4 と DUM-4 は双方共薄層クロマトグラフィー (TLC) (プレート: メルク社製シリカゲル Art 5715 溶媒: ベンゼン: アセトン: 酢酸 = 60:50:3) により  $R_f$  値 0.45 を示す。上記抽出液を飽和食塩溶液で洗浄し, ジアゾメタンのエーテル溶液を加え, 30 分放置後, 減圧乾固した。残渣をローバー・カラム (メルク社製 SI 60, サイズ A) にかけ, ベンゼン: 酢酸エチル = 1:1 の系で精製すると Iso DUM-4 メチルエステルを含む区分 (活性区分①) と DUM-4 メチルエステルを含む区分 (活性区分②) に分けられる。活性区分①は 200mg が得られた。活性区分①をローバー・カラム (メルク社製 RP-8 サイズ A) を用い, 35% アセトニトリルで溶出し, Iso DUM-4 メチルエステルの精製標品 78mg が無色油状体として得られた。なお本操作におけるジアゾメタンに代えて, 適当なジアゾアルカンを使用すると該当する Iso DUM-4

 $R_f$  値 0.88

## 実施例 3

実施例 1 に示したのと同組成の培地 100mL を含有する 500mL 容坂口フラスコ 20 本にアブシディア・コエルレア IFO 4423 を種蔭し, 26°C, 120 rpm で振盪培養し, 2 日後, ML-238 B Na 塩を最終濃度で 0.05% になるように添加して更に 5 日間 26°C, 120 rpm で培養する。

培養終了後, 變換反応液を沪過し, 沪液をトリフルオロ酢酸で pH 3 に調整した。次いで, 1 mL の酢酸エチルで 3 回抽出すると DUM-3 と DUM-4 と Iso DUM-4 を含む区分が得られる。この中, DUM-4 と Iso DUM-4 は双方共薄層クロマトグラフィー (TLC) (プレート: メルク社製シリカゲル Art 5715 溶媒: ベンゼン: アセトン: 酢酸 = 60:50:3) により  $R_f$  値 0.45 を示す。上記抽出液を飽和食塩溶液で洗浄し, ジアゾメタンのエーテル溶液を加え, 30 分放置後, 減圧乾固した。残渣をローバー・カラム (メルク社製 SI 60, サイ

のアルキルエステルが得られる。Iso DUM-4 メチルエステルは次の特性を有する。

## 1) NMRスペクトル

重クロロホルム中, 内部標準に TMS を使用して, 100 MHz で測定した NMR スペクトルを第 1 図に示す。

## 2) マススペクトル

N, O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドでシリル化した後, 日本電子製 D-300 型を用いて測定した。

$M_{rel}^+$  : 854( $M^+$ ), 552, 462, 372,  
 272, 233, 231

## 3) 紫外部吸収スペクトル(メタノール溶液)

$\lambda_{max}$ (nm) : 229, 234.8, 244.5

## 4) 赤外部吸収スペクトル(薄層法)

第 2 図に示す。

## 5) TLC

TLC プレート: メルク社製シリカゲル  
 Art 5715

溶媒: ベンゼン: アセトン (1:1)

メタ）にかけ、ベンゼン：酢酸エチル=1:1の系で精製すると Iso DUM-4 メチルエステルを含む区分（活性区分①）と DUM-4 メチルエステルを含む区分（活性区分②）に分けられる。活性区分②は 185.3% が得られた。活性区分②をローバー・カラム（メルク社製 RP-8, サイズ A）を用い、35% アセトニトリルで溶出し、DUM-4 メチルエステルの精製標品 20% が無色油状体として得られた。なお本操作におけるジアゾメタンに代えて、適当なジアゾアルカンを使用すると該当する DUM-4 のアルキルエステルが得られる。

DUM-4 メチルエステルは次の特性を有する。

#### 1) NMR スペクトル

重クロロホルム中内部基準に TMS を使用して 200 MHz で測定した。

(CDCl<sub>3</sub>) δ ppm :

- 0.88 (3 H, t, J = 7.3 Hz)
- 0.89 (3 H, d, J = 6.5 Hz)
- 1.12 (3 H, d, J = 6.8 Hz)

$\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$  : 230.1, 273.3, 246.4

4) 赤外部吸収スペクトル（薄膜法）cm<sup>-1</sup> :  
3400, 2950, 1730

#### 5) TLC

TLC ブレート：メルク社製シリカゲル  
Art 5715

溶媒：ベンゼン：アセトン (1:1)

R<sub>f</sub> 値 : 0.88

#### 実施例 4

ガニンガメラ・エチスラー IFO 4445 を用い、実施例 1 と同様に操作して DUM-3 ラクトンを得た。

#### 実施例 5

シンセフアロスボラム・ラセモーザム IFO 4828 を用い、実施例 1 と同様に操作して DUM-3 ラクトンを得た。

#### 実施例 6

シンセフアロスボラム・ラセモーザム IFO 4814 を用い、実施例 1 と同様に操作して DUM-3 ラクトンを得た。

- 1.1 ~ 1.7 (10 H, m)
- 2.34 (1 H, sex, J = 7 Hz)
- 2.3 ~ 2.5 (2 H, m)
- 2.49 (2 H, d, J = 6.4 Hz)
- 2.58 (1 H, m)
- 3.72 (3 H, s)
- 3.78 (1 H, m)
- 4.25 (1 H, quin, J = 7 Hz)
- 4.4 (1 H, m)
- 5.42 (1 H, m)
- 5.56 (1 H, m)
- 5.90 (1 H, d, d, J = 9.8, 5.6 Hz)
- 5.99 (1 H, d, J = 9.8 Hz)

#### 2) マススペクトル

N, O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドでシリル化した後、日本電子製 D-300 型を用いて測定した。

M<sub>n</sub> : 654 (M<sup>+</sup>), 552, 462, 372,  
290, 272, 239, 231

#### 3) 紫外部吸収スペクトル（エタノール溶液）

#### 実施例 7

ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス NRRL 1233 を用い、実施例 1 と同様に操作して DUM-3 ラクトンを得た。

#### 実施例 8

ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス IFO 3863 を用い、実施例 1 と同様に操作して DUM-3 ラクトンを得た。

#### 実施例 9

ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス IFO 3411 を用いて、実施例 1 と同様に処理して DUM-3 ラクトンを得た。

#### 実施例 10

ストレプトマイセス・ヘルスティディ IFO 3199 を用い、実施例 1 と同様に処理して DUM-3 ラクトンを得た。

#### 実施例 11

ストレプトマイセス・ブランシス NRRL 2364 を用い、実施例 1 と同様に操作して DUM-3 ラクトンを得た。

## 実施例 12

ストレプトマイセス・ファルビシマス NRRL B-1453 を用い、実施例 1 と同様に操作して DUM-3 ラクトンを得た。

## 実施例 13

アブシデイア・コエルリア IFO 4423 を用いて実施例 2 と同様に操作して、ML-286B の変換反応液 1.9 L を得た。丹波をトリフルオロ酢酸で pH 3.0 に調整した。次いで、1 L の酢酸エチルで 3 回抽出すると DUM-3 と Iso-DUM-4 と DUM-4 を含む区分が得られる。上記抽出液を飽和食塩水で洗浄し、減圧乾固してラクトンを得た。残渣をローバー・カラム（メルク社製 SI-60 サイズ A）にかけ、Iso-DUM-4 ラクトン区分と DUM-4 ラクトン区分を分離採取した。Iso-DUM-4 ラクトン区分をベンゼン：酢酸エチル（1：1）の系で精製し、Iso-DUM-4 ラクトン 198 mg が得られた。更にこれをローバー・カラム（メルク社製 RP-8 サイズ A）を用い、35% アセトニトリルで

溶出し、Iso-DUM-4 ラクトンの精製標品 82 mg が得られた。

Iso-DUM-4 ラクトンは次の特性を有する。

## 1) NMR スペクトル

直クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して 100 MHz で測定した NMR スペクトルを第 3 図に示す。

## 2) 紫外部吸収スペクトル（メタノール溶液）

$$\lambda_{\text{max}}(\text{nm}) : 229, 234.8, 244.5$$

## 3) 赤外部吸収スペクトル（薄膜法）

第 4 図に示す。

## 実施例 14

カニンガメラ・エナスター IFO 4445 を用い、実施例 13 と同様に操作して Iso-DUM-4 ラクトンを得た。

## 実施例 15

シンセフアロスボラム・ラセモーサム IFO 4828 を用い、実施例 13 と同様に操作して Iso-DUM-4 ラクトンを得た。

## 実施例 16

## 4) TLC

TLC プレート：メルク社製シリカゲル

Art 5715

溶媒：ベンゼン：アセトン：酢酸 = 50 : 50

: 3

R<sub>f</sub> 値 0.62

## 実施例 19

実施例 1 と同様に操作して得た酢酸エチル抽出液を飽和食塩溶液で洗浄し、ジアゾメタンのエーテル溶液を加え 30 分放置後、減圧乾固した。残渣をローバー・カラム（メルク社製 SI-60 サイズ A）にかけ、ベンゼン：酢酸エチル（1：1）の系で精製し、再度ローバー・カラム（メルク社製 RP-8 サイズ A）にかけ、35% アセトニトリルで溶出し、DUM-3 メチルエステルの精製標品を得た。なお本操作におけるジアゾメタンに代えて適当なジアゾアルカンを使用すると該当する DUM-3 のアルキルエステルが得られる。

DUM-3 メチルエステルの物性値は次の通り

シンセフアロスボラム・ラセモーサム IFO 4828 を用い、実施例 13 と同様に操作して Iso-DUM-4 ラクトンを得た。

## 実施例 17

ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス NRRL 1283 を用い、実施例 13 の方法に従つて Iso-DUM-4 ラクトンを得た。

## 実施例 18

実施例 18 と同様に操作して、ローバー・カラムで分離した DUM-4 区分を同様に精製して DUM-4 ラクトンを得た。

DUM-4 ラクトンは次の物性値を有する。

## 1) NMR スペクトル

直クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して、60 MHz で測定した NMR スペクトルを第 5 図に示す。

## 2) 紫外部吸収スペクトル（メタノール溶液）

$$\lambda_{\text{max}}(\text{nm}) = 230, 236.7, 244.6$$

3) 赤外部吸収スペクトル（薄膜法） cm<sup>-1</sup>

$$3400, 2950, 1725$$

である。

- 1) 質量分析 ( $M^+$ ) : 456
- 2) 元素分析値:  $C_{14}H_{14}O_2$  として  
計算値 C: 60.53 H: 8.77  
実測値 C: 61.02 H: 8.90
- 3) 紫外部吸収スペクトル (メタノール溶液)  
末端吸収のみ
- 4) 赤外部吸収スペクトル (液膜法)  
 $\lambda_{max} \text{ cm}^{-1}$ : 3300, 1720
- 5) NMRスペクトル ( $CDCl_3$ ) δ ppm:  
5.9 (1H, 二重二重線,  $J = 1.5, 5 \text{ Hz}$ )  
5.3 (1H, 多重線)  
4.2 ~ 3.8 (3H, 多重線)  
3.6 (3H, 一重線)  
2.6 (2H, 二重線)
- 6) 遷光度  $[\alpha]_D^{20} : +35^\circ$  (C=1.02, メタノール)

#### 実施例 20

下記組成の培地 100mLを含有する 500mL容瓶  
ロフラスコ 20本にアブシディア・コエルレア  
IFO 4423 を種蒔し, 26°C, 120 rpm で振

株品 830mgを得た。これを高速液体クロマトグラフ (カラム:マイクロポンダーパック C18, 40%メタノール 1mL/min)によりくり返し精製し, DUM-4ナトリウム塩, Iso DUM-4 ナトリウム塩を各々 32mg, 280mg 得た。  
DUM-4ナトリウム塩および Iso DUM-4 ナトリウム塩は次の特性を有する。

#### DUM-4ナトリウム塩

##### 1) NMRスペクトル

■メタノール中、内部基準に TMS を使用して 200MHz で測定した。

##### (CD<sub>3</sub>OD) δ ppm :

- 0.91 (3H, t,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ )
- 0.92 (3H, d,  $J = 7 \text{ Hz}$ )
- 1.12 (3H, d,  $J = 7 \text{ Hz}$ )
- 1.1 ~ 1.8 (10H, m)
- 2.25 (1H, d, d,  $J = 15, 7.5 \text{ Hz}$ )
- 2.34 (1H, d, d,  $J = 15, 5.5 \text{ Hz}$ )
- 2.2 ~ 2.4 (3H, m)
- 2.48 (1H, m)

並培養し、2日後、ML-236B Na塩を最終濃度で 0.05% になるよう添加して更に 5 日間 26°C, 120 rpm で培養する。

#### 培地組成

グルコース	2.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.15
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1
ペプトン	0.1
C.S.L	0.2
イーストエキストラクト	0.1
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001
水道水	残
	(pH 7.0 KC調整)

培養終了後、変換反応液を沪過し、沪液を HP-20 カラム (三桠化成社製) に吸着させ、水洗後、50%アセトンで DUM-4 ナトリウム塩、Iso DUM-4 ナトリウム塩および DUM-3 ナトリウム塩を含有する区分を溶出し、凍結乾

- 3.68 (1H, m)
- 4.07 (1H, m)
- 4.28 (1H, m)
- 5.36 (1H, m)
- 5.48 (1H, d, d,  $J = 3, 2 \text{ Hz}$ )
- 5.88 (1H, d, d,  $J = 9.6, 5.3 \text{ Hz}$ )
- 5.98 (1H, d,  $J = 9.8 \text{ Hz}$ )

##### 2) 紫外部吸収スペクトル (メタノール溶液)

$$\lambda_{max}(\text{nm}) : 280.0, 237.2, 245.0$$

##### 3) 赤外部吸収スペクトル (KBr 法) $\text{cm}^{-1}$ :

$$3400, 2900, 1725, 1580$$

##### 4) TLC

TLC ブレート: メルク社製シリカゲル

Art 5715

溶媒: ベンゼン: アセトン: 酢酸 (50: 50 : 3)

R<sub>f</sub> 値 0.45

Iso DUM-4 ナトリウム塩

##### 1) 紫外部吸収スペクトル (メタノール溶液)

$$\lambda_{max}(\text{nm}) : 229(\text{sh}), 235, 245(\text{sh})$$

## 実施例 24

シンセフアロスボラム・ラセモーサム IFO 4828 を用い、実施例 3 と同様に操作して DUM - 4 メチルエステルを得た。

## コレステロール合成阻害作用

前記式(1)で示される化合物はコレステロール合成経路上の律速酵素として知られる 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイム A リダクターゼ (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Co A reductase) を特異的に阻害することが分った。これら化合物のコレステロール合成阻害作用 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 234巻 2835頁 (1959年) 記載の方法で測定] を第1表に示す。

2) 赤外部吸収スペクトル (KBr 法)  $\text{cm}^{-1}$ 

3400, 2850, 1710, 1580

## 3) TLC

TLC プレート：メルク社製シリカゲル

Art 8715

溶媒：ベンゼン：アセトン：酢酸 (50:50  
:8)

$R_f$  値 0.45

## 実施例 21

カニンガメラ・エヌスラータ IFO 4445 を用い、実施例 3 と同様に操作して DUM - 4 メチルエステルを得た。

## 実施例 22

ストレプトマイセス・ロゼオクロモグナス N R R L 1233 を用い、実施例 3 と同様に操作して DUM - 4 メチルエステルを得た。

## 実施例 23

シンセフアロスボラム・ラセモーサム IFO 4814 を用い、実施例 3 と同様に操作して DUM - 4 メチルエステルを得た。

第1表 コレステロール合成を 50% 阻害する濃度

	$\mu\text{g}/\text{ml}$
DUM - 3	0.26
DUM - 3 ラクトン	0.26
DUM - 3 メチルエスティル	0.065
DUM - 4 メチルエスティル	0.001
DUM - 4 Na 塩	0.0008
Iso DUM - 4 メチルエスティル	0.007
Iso DUM - 4 ラクタシ	0.018
ML - 236 B (对照)	0.01

は DUM - 4 ラクトンの NMR スペクトルを示す。

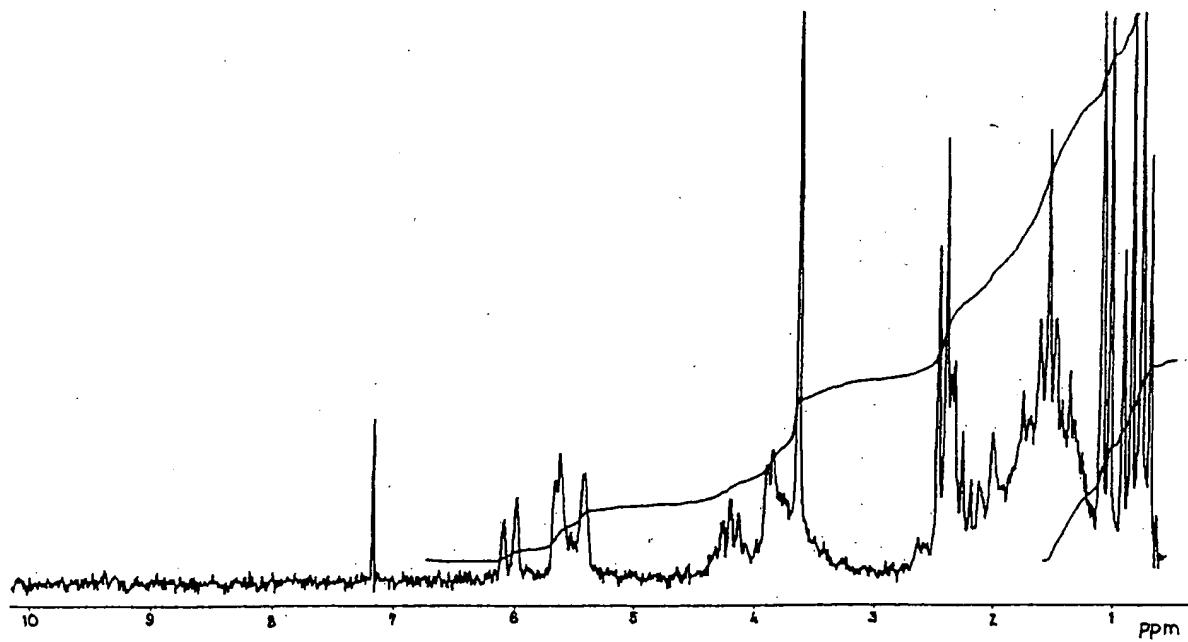
特許出願人 三共株式会社

代理人弁理士 棚出庄治

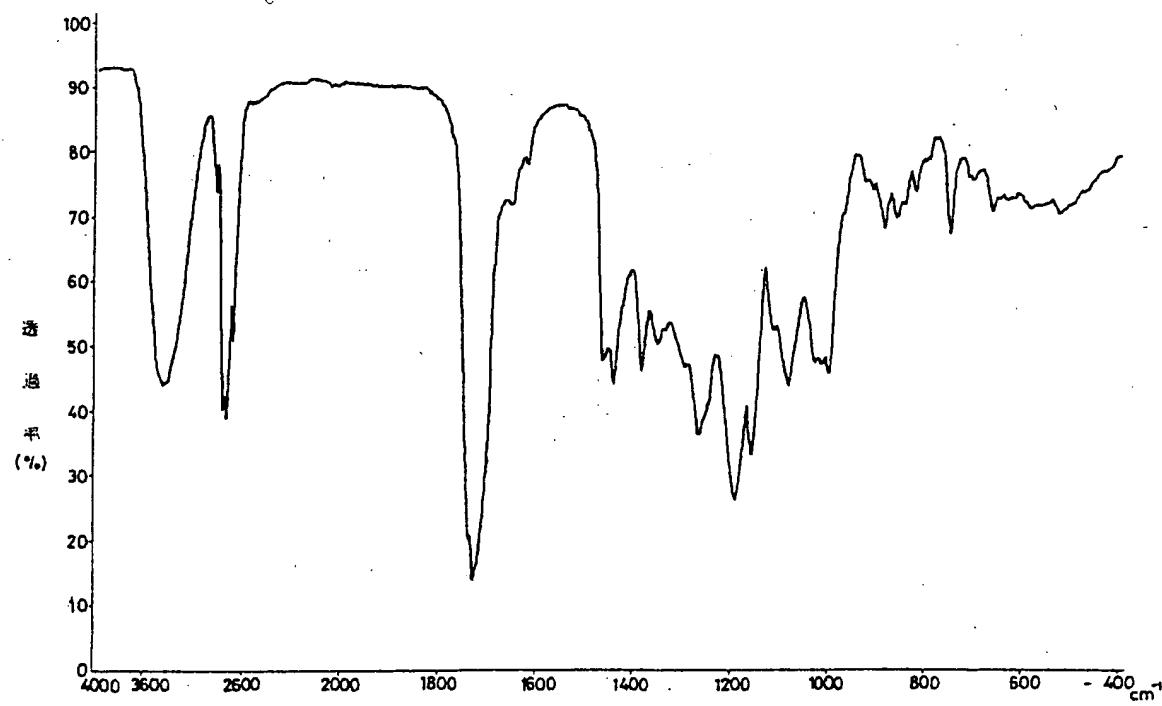
## 4 図面の簡単な説明

第1図は Iso DUM - 4 メチルエスティルの NMR スペクトルを示し、第2図は同物質の赤外吸収スペクトルを示す。第3図は Iso DUM - 4 ラクトンの NMR スペクトルを示し、第4図は同物質の赤外吸収スペクトルを示す。第5図

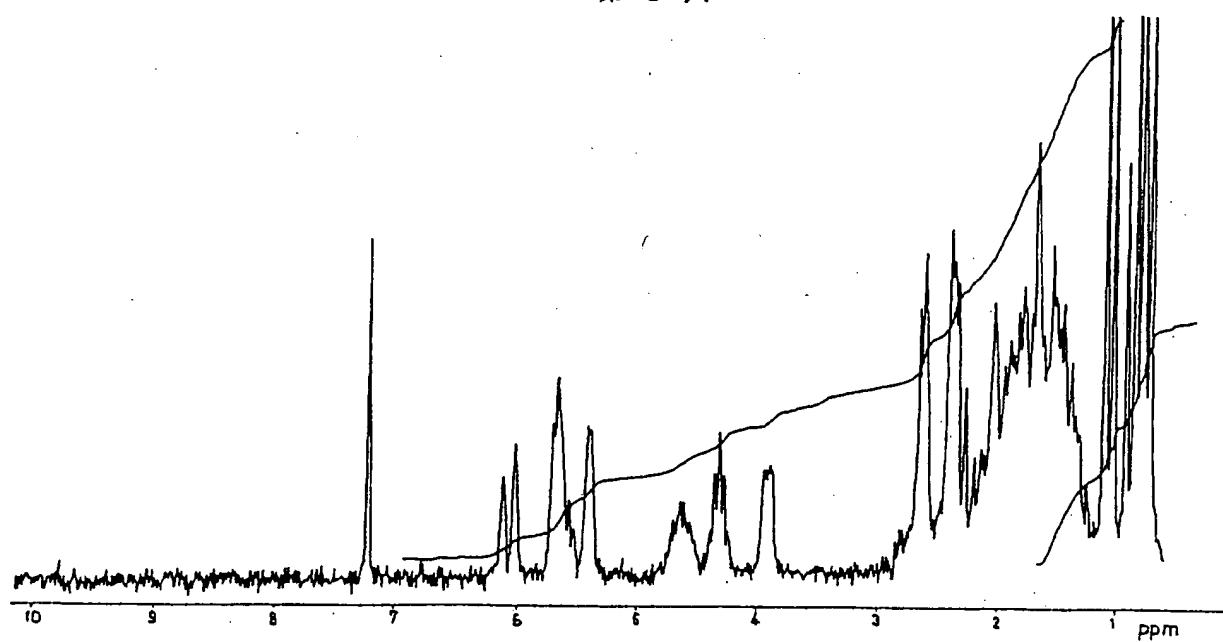
第 1 図



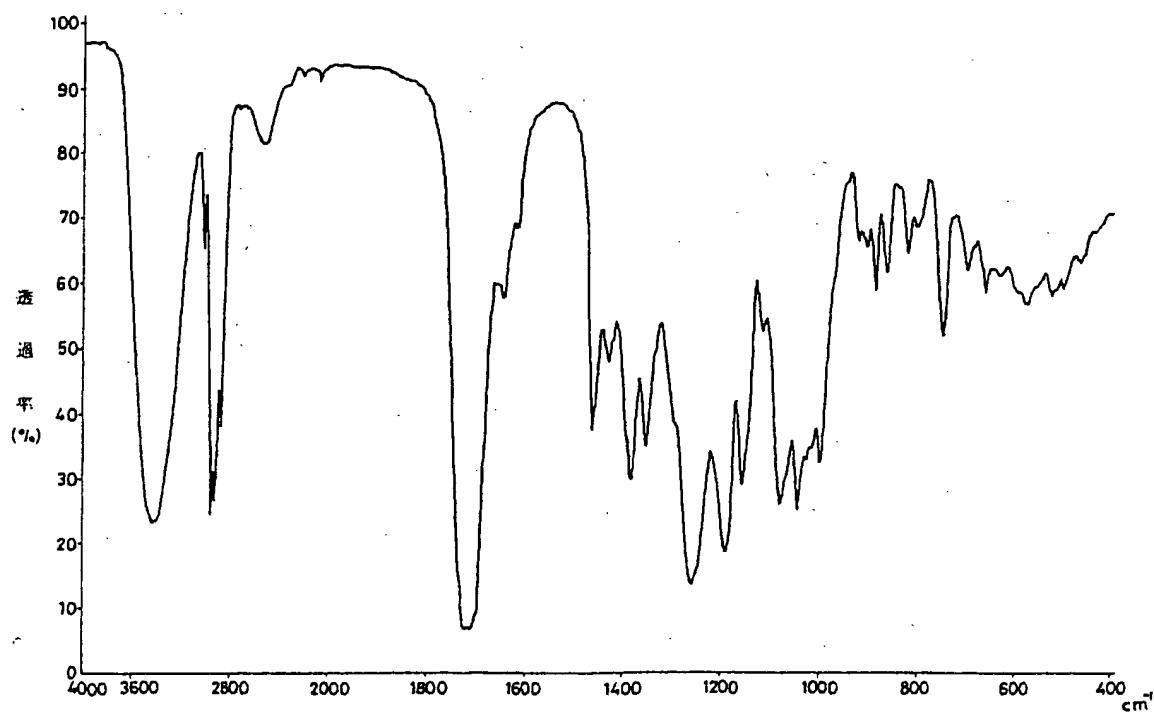
第 2 図



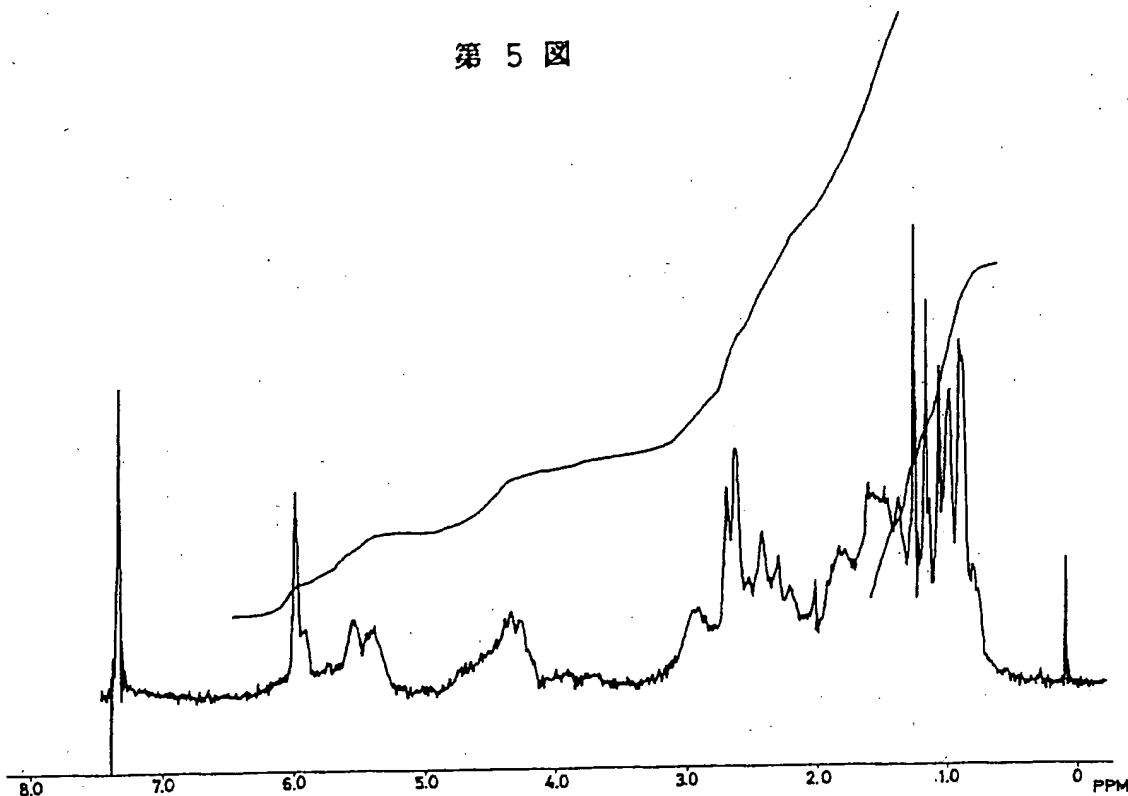
第3図



第4図



第 5 図



## 手続補正書(自発)

昭和 55 年 11 月 25 日

特許庁長官 島田 春樹 殿

## 1. 事件の表記

昭和 55 年特許願第 124385 号

## 2. 発明の名称

ML-236B 誘導体の製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目1番地の6

名称 (186) 三共株式会社

代表者 取締役社長 河村 喜典

## 4. 代理人

居所 〒140 東京都品川区広町1丁目2番58号

三共株式会社内

電話 492-3131

氏名 弁理士 (8007) 横出 庄治

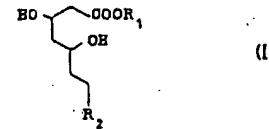
## 5. 補正により増加する発明の数 なし

## 6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲の欄、発明の詳細な説明の欄および図面の簡単な説明の欄

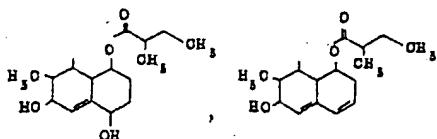
## 7. 補正の内容 別紙の通り

1. 明細書の特許請求の範囲を次の通り訂正する。

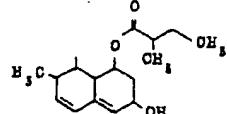
「ML-236B を式(I)で示される ML-236B 誘導体に交換し得るアブシディア属、カニンガメラ属、シゼファラストラム属またはストレブトマイセス属に属する微生物を、ML-236B を含有する培地で培養するか、或いはこれらの微生物の酵素抽出液と ML-236B を接触せしめて、ML-236B を式



(式中、R<sub>1</sub>は水素原子、低級アルキル基またはアルカリ金属を示し、R<sub>2</sub>は基



または



を示す。)で示される M L - 238 B 誘導体もしくはこの衍生物ラクトン体に変換せしめ、培養物より該 M L - 238 B 誘導体を採取することを特徴とする  
M L - 238 B 誘導体の製造法。」

2. 明細書第 8 頁下から 2 行、第 7 頁 7 行、同頁 10 行、第 17 頁 14 行、同頁 18 行、第 20 頁 17 行、第 21 頁 1 行、第 27 頁 18 行および第 28 頁 2 行の

「シンセフアロスボラム」を

「シシセフアラストラム」と訂正する。

3. 同第 8 頁下から 2 行、第 7 頁 8 行および同頁 12 行の

「M - 3」と訂正する。

7. 同第 4 頁 7 行、第 5 頁 3 行、同頁 8 ~ 8 行、同頁 11 行、第 10 頁 7 行、第 12 頁 1 行、同頁 2 ~ 3 行、同頁 12 行、第 14 頁 12 行、同頁 13 行、第 13 頁 3 行、同頁 8 行、同頁 11 行、同頁 13 行、第 13 頁 11 行、同頁 15 行、第 21 頁 10 行、同頁 11 行、同頁 12 行、第 24 頁 17 行、第 25 頁 4 行、同頁 6 行、同頁 8 行、第 27 頁 11 行、同頁 18 行、同頁 19 ~ 20 行、第 28 頁 3 ~ 4 行および第 30 頁 1 行の

「DUM - 4」を

「M - 4」と訂正する。

8. 同第 5 頁 1 行、第 10 頁 7 行、第 12 頁 1 行、同頁 2 行、同頁 11 行、同頁 17 行、同頁末行、第 13 頁 1 ~ 2 行、第 14 頁 12 行、同頁 13 行、第 15 頁 2 行、第 18 頁 10 ~ 11 行、同頁 14 ~ 15 行、同頁 18 行、同頁 18 行、第 20 頁 1 行、同頁 3 行、同頁 14 ~ 15 行、同頁 18 ~ 19 行、第 21 頁 2 ~

「Syncopalosporum」を

「Syncopalostrum」と訂正する。

4. 同第 8 頁 8 行、同頁 12 行、第 11 頁 15 行、同頁 17 行、第 14 頁 6 行、同頁 8 行、第 23 頁末行および第 24 頁 1 行の

「rpm」を

「s.p.m.」と訂正する。

5. 同第 17 頁 1 行の

「2723」を

「2373」と訂正する。

6. 同第 4 頁 5 行、第 5 頁 2 行、第 10 頁 8 行、同頁 8 行、同頁 12 行、同頁 18 行、第 11 頁末行、第 14 頁 11 行、第 17 頁 11 行、同頁 15 ~ 16 行、同頁 18 ~ 20 行、第 18 頁 4 行、同頁 8 行、同頁 12 行、同頁 15 ~ 16 行、同頁 18 ~ 20 行、第 18 頁 3 ~ 4 行、同頁 10 行、第 22 頁 15 行、同頁 18 行、同頁末行および第 24 頁 1 行の

「DUM - 3」を

3 行、同頁 7 行、第 24 頁 18 行、第 25 頁 4 行、同頁 8 行、第 28 頁 13 行および同頁 15 ~ 18 行の

「I<sub>so</sub>DUM - 4」を

「イソM - 4」と訂正する。

8. 同第 28 頁 18 行の

「I<sub>so</sub>DUM - ナトリウム塩」を

「イソM - 4ナトリウム塩」と訂正する。

10. 同第 28 頁の第 1 表を次の通り訂正する。

「 第 1 表 コレステロール合成を阻害する濃度

	μg/ml
M - 3	0.28
M - 3 ラクトン	0.28
M - 3 メチルエステル	0.085
M - 4 メチルエステル	0.001
M - 4 Na 塩	0.0008
イソM - 4 メチルエステル	0.007
イソM - 4 ラクトン	0.013
M L - 238 B (対照)	0.01

11. 同第18頁8行の

「伊波を」を

「変換反応液を伊過し、伊波を」と訂正する。

12. 同第18頁13～14行の

「抽出液を……得た。」を

「硫酸ナトリウムで脱水後、触媒量のトリフルオロ酢酸を添加してラクトン化した。次いで上記抽出液を5当量水素ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、減圧乾固した。」と訂正する。

13. 同第18頁12～13行の

「混雑乾固してラクトンを得た。」を

「硫酸ナトリウムで脱水後、触媒量のトリフルオロ酢酸を添加してラクトン化した。次いで上記抽出液を5当量水素ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、減圧乾固した。」と訂正する。

14. 同頁14行の

「にかけ」を

「にかけ酢酸エチルで溶出し」と訂正する。

以上